

Figuras 1-4. *Vitrinorbis arabscripta* spec. nov. 1: holotipo (MNCN); 2: paratipo en la colección de F. Rubio; 3-4: paratipo en la colección de E. Rolán. Escalas 0,1 mm.

Figures 1-4. *Vitrinorbis arabscripta* n. sp. 1: holotype (MNCN); 2: paratype in F. Rubio collection; 3-4: paratype in E. Rolán collection. Scale bars 0.1 mm.

dones espirales y tiene costillas axiales marcadas, *Granigyra* Dall, 1889, que además tiene una escultura granular y *Dikoleps* Höisaeter, 1968, que puede tener una microescultura similar, pero en sentido espiral sólo tiene ribetes periumbilicales.

ADDENDA

Con posterioridad a la aceptación de este manuscrito, se ha representado una concha de *Vitrinorbis arabscripta* en BONFITTO, OLIVERIO, SABELLI Y TAVIANI (1994, figs. 7-11, citado como *Orbitestella dariae* (Liuzzi y Stolfa-Zucchi, 1979)), obtenida en sedimentos dragados entre

AGRADECIMIENTOS

A María de los Ángeles Rodríguez Cobos por las fotografías hechas en el microscopio electrónico de barrido de la Cátedra de Anatomía de la Universidad de Santiago de Compostela.

200 y 400 m de profundidad a la altura de la costa de Latium.

Dicha representación es la primera mención de *V. arabscripta* en el Mediterráneo, aunque se supone que se trata de material de depósitos cuaternarios y no es una especie actualmente viviente.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, R. T., 1974. *American seashells*. (2^a Ed.). Van Nostrand Reinhold Co. New York. 663 pp., 24 lám.
- ADAM, W. y KNUDSEN, J., 1969. Quelques genres de mollusques prosobranches marins inconnus ou peu connus de l'Afrique occidentale. *Bulletin Institute royal de Sciences naturelles, Belgique*, 44: 1-69.
- BONFITTO, A., OLIVERIO, M., SABELLI, B. y TAVIANI, M., 1994. A Quaternary deep-sea marine molluscan assemblage from east Sardinia (Western Tyrrhenian Sea). *Bollettino Malacologico*, 30 (5-9): 141-157.
- OLSSON, A. A. y MCGINTY, T. L., 1958. Recent marine molluscs from the Caribbean coast of Panama with the description of some new genera and species. *Bulletin of American Paleontology*, 39: 1-38, 5 lám.
- PALAZZI, S. 1993. Note sugli Omalogyridae mediterranei e maderensi. Aggiunte. *Bollettino Malacologico*, 28 (5-12): 139-144.
- RINDONE, V. y VAZZANA, A., 1989. Alcune specie di Molluschi delle argille batiali del piano Siciliano (Pleistocene inf.) della cava di Archi (Reggio Calabria). *Bollettino Malacologico*, 25 (5-8): 233-240.
- WARÉN, A. 1992. New and little known "Skeineimorph" gastropods from the Mediterranean Sea and the adjacent Atlantic Ocean. *Bollettino Malacologico*, 27 (10-12): 149-248.

Recibido el 5-I-1993
Aceptado el 18-VI-1993

Los Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) a la luz de nuevas técnicas para el análisis cariotípico y de la gametogénesis

The Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) in the light of new techniques for the karyotype and gametogenesis analysis

Ana María ALDERETE DE MAJO*

RESUMEN

Se ha realizado el análisis cromosómico, cariotípico, de la espermatogénesis y morfológico de los gametos masculinos de *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae), mediante técnicas eminentemente citogenéticas, nuevas y/o puestas a punto para gasterópodos terrestres.

Los resultados obtenidos han permitido determinar el número haploide de dicha especie ($n= 17$) y confeccionar el cariotipo basado en los bivalentes en paquitene. Asimismo, se han analizado los distintos tipos celulares que intervienen en el proceso de espermatogénesis y la morfología del espermatozoide, concluyendo que éste sería de tipo primitivo.

Se discuten los métodos empleados, los resultados obtenidos y la posición sistemática de los Veronicellidae basado en el número cromosómico y la morfología de los gametos masculinos de la especie estudiada, en el contexto de los Euthyneura.

ABSTRACT

Chromosomal and karyological analysis was developed, as well as the spermatogenesis and morphology of the male gamete of *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae) based on new cytogenetic techniques or others, adjusted for the proper study of terrestrial gastropods.

The results allowed to determine the haploid number of the species ($n= 17$) and the karyotypical analysis based on the pachytene bivalents. We have also analyzed the different cellular types of the spermatogenesis as well as the morphology of the spermatozoon, concluding that it can belong to the primitive type.

Methods, results and the taxonomic position of the Veronicellidae based in chromosomal number and the morphology of the male gamete in Euthyneura are discussed.

PALABRAS CLAVE: Gastropoda, Veronicellidae, técnicas citogenéticas, cariotipo, gametogénesis, filogenia.

KEY WORDS: Gastropoda, Veronicellidae, cytogenetic technics, karyotype, gametogenesis, phylogeny.

* Cátedra de Invertebrados. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205. (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina.

INTRODUCCIÓN

La posición filogenética de la familia Veronicellidae continúa discutida, admitiéndose que juntamente con las familias Onchidiidae y Rathousiidae, constituyen el orden Soleolifera (THOMÉ, 1975). PLATE (1893), FRETTER (1943), BOETTGER (1955) y HYMAN (1967) sostuvieron que el lugar más razonable era con o cerca de los órdenes de Opisthobranchia y tal posición fue seguida por ZILCH (1959-1960) y TAYLOR Y SOHL (1962). Otros, como HOFFMANN (1925, 1927), PILSBRY (1948) y VAN MOL (1967), la ubicaron con los Pulmonata (el último autor los ubica por encima de los Stylommatophora). STRINGER (1963), MORTON (1963), SALVINI-PLAWEN (1970) y MINICHEV (1975), los consideraron una línea evolutiva *per se*, separada tanto de los Opisthobranchia como de los Pulmonata, como un nuevo grupo prepulmonado (SALVINI-PLAWEN, 1980).

Al considerar los números cromosómicos en varios grupos de Euthyneura, en líneas generales, puede decirse que el número haploide de los Opisthobranchia es menor de 18, el de los Basommatophora 18 y el de casi todos los miembros de caracoles conchíferos Stylommatophora, mayor que 18 (BURCH, 1960). Con respecto a los Soleolifera, hay una escasa información valorable sobre el número cromosómico *per se*, basada en $n = 16, 17$ y 18 . Sus números cromosómicos se solapan con algunos de los órdenes de Opisthobranchia, como son los casos de Cephalaspidea ($n = 17, 18$), Sacoglossa ($n = 7, 17$), Entomotaeniata ($n = 17$) y Anaspidea ($n = 17$), como así también con aquellos de Basommatophora ($n = 15, 16, 17, 18, 19$, excluyendo números poliploides) y los Stylommatophora Succineidae ($n = 5, 6, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25$) (PATTERSON, 1969). Todos los demás Stylommatophora poseen números mayores que los Soleolifera (PATTERSON Y BURCH, 1978). En efecto, de 11 familias estudiadas cromosómicamente del primer grupo, el número haploide más frecuente fue 29 (MAKINO, 1951 y RAINER, 1967). Los extremos del rango para dichas familias,

con excepción de los Succineidae, son 21 y 34. Además, las babosas estudiadas presentan generalmente los números haploides más altos del grupo: 30, 31, 34 (BEESON, 1960) (Fig. 1).

En cuanto al análisis de la gametogénesis en Soleolifera, ha sido estudiada en Onchidiidae, precisamente en *Onchidella celtica* por TUZET (1940), referida a la espermatogénesis y por GABE (1951) sobre la ovogénesis y en los Veronicellidae, por HOFFMANN (1925 a) y QUATTRINI Y LANZA (1964a, b, c, 1965a, b). Los últimos realizaron el análisis de la estructura de la gónada y los procesos de espermatogénesis y ovogénesis en *Vaginulus borellianus* (Colosi) y en *Laevicaulis alte* (Férussac). Estas investigaciones fueron llevadas a cabo tanto a nivel de microscopía óptica como electrónica. Los estudios basados en microscopía óptica han sido hechos fundamentalmente sobre material obtenido por cortes histológicos de la gónada o por aplastamiento de ella. Si bien los resultados abordados han brindado un conocimiento generalizado de los diferentes fenómenos, el empleo de técnicas histológicas clásicas impuso diversas limitaciones a la interpretación de los hallazgos. Posteriormente, el desarrollo de la técnica de "air-drying" modificada para oligoquetos terrícolas (ALDERETE DE MAJO, TOMSIC, DULOUT Y TEISAIRE, 1979) resolvió en gran parte los problemas, permitiendo un análisis morfológico, tanto en sus aspectos cuantitativos como cualitativos y sirvió también de base metodológica para el desarrollo de técnicas distintas (ALDERETE DE MAJO, 1988).

En cuanto a *Sarasinula linguaeformis*, no existe antecedente alguno, hasta nuestras investigaciones, sobre el número cromosómico y el análisis cariotípico y de la gametogénesis. Es por ello que se ha abordado el estudio de los aspectos antes citados, mediante técnicas nuevas y/o puestas a punto para Gastropoda y empleadas por vez primera en moluscos. (ALDERETE DE MAJO, MERCADO LACZKO Y USANDIVARAS, 1996; ALDERETE DE MAJO, USANDIVARAS Y MERCADO LACZKO, 1996).

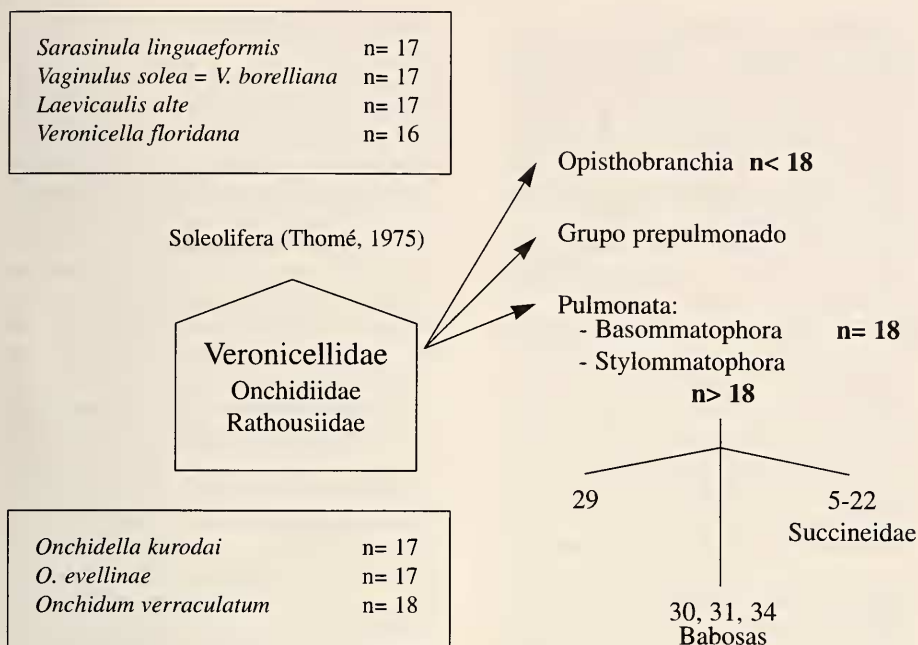


Figura 1. Números cromosómicos de algunos Euthyneura.

Figure 1. Chromosomic numbers of some Euthyneura

MATERIAL Y MÉTODOS

Especie estudiada: *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885). La identificación taxonómica de los ejemplares fue realizada por el Dr. J. W. Thomé, del Museo de Ciencias Naturales, Fundación de Zoobotánica de Río Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. La cita de esta especie para Tucumán y Argentina en nuestros trabajos, constituye el primer registro.

Datos de colecta: Los 112 ejemplares empleados fueron recolectados en la localidad de San Miguel de Tucumán durante los años 1990 y 1991, incluyendo las cuatro estaciones.

Los ejemplares fueron procesados individualmente según las siguientes pasos:

- Administración de solución de colchicina al 0,01% en tampón isotónico pH

8,4 para gasterópodos terrestres, en una proporción de 0,1 ml por gramo de peso vivo, por vía oral, 3 horas previas al sacrificio (en el caso del análisis cromosómico). Para tal fin, se empleó una jeringa de tuberculina provista de una aguja descartable y cubierta por un capilar de vidrio, con un extremo pegado a su base plástica y el otro, adelgazado con calor y redondeado su borde, para impedir lesiones al ser introducido en la boca del animal (técnica ésta empleada para la administración de Timidina tritizada a oligoquetos terrícolas por ALDERETE DE MAJO, 1988).

- Narcosis, disección, extracción de la gónada hermafrodita y traslado de la misma a un vidrio de reloj con el tampón antes citado.

- Técnica de "air-drying" modificada para oligoquetos terrícolas y puesta a punto para gasterópodos terrestres. Esta técnica incluye los siguientes pasos:

- Disgregado de la gónada en solución isotónica, por medio de tijeras de puntas finas en un vidrio de reloj y con pipeta Pasteur en tubo de centrifuga graduado.

- Lavado de las células en el tampón por centrifugación a 800 r. p. m., durante 5 minutos; extracción del sobrenadante y resuspensión en solución isotónica nueva. Repetición del paso anterior dos veces más, con la diferencia de que en la última extracción se dejan 0,5 ml del sobrenadante, cantidad en la que se resuspende el material disgregado.

- Tratamiento hipotónico con KCl 0,07 M durante 40 a 45 minutos y a 37 °C (en el caso del análisis cromosómico).

- Fijación en alcohol metílico-ácido acético glacial (3:1) durante 3 a 12 horas a 4 °C. Lavado de las células en fijador, mediante resuspensión y centrifugado a 800 r. p. m. durante 5 minutos del material en fijador fresco. Repetición de este paso 3 veces. Resuspensión del material en una cantidad apropiada del fijador, acorde con el volumen de células disponibles.

- Goteo del material procesado sobre portaobjetos congelados y secado con corriente de aire.

- Tinción con Giemsa, Carbol-Fucsina según CARR Y WALKER (1961) y por medio de la reacción de Feulgen (llevada a cabo a fin de estudiar la cromatina, y realizar además un estudio citológico del citóforo)

Esta técnica fue desarrollada en el análisis de todos los objetivos propuestos.

• Técnica para la observación de elementos celulares vivos en microscopía de contraste de fase. Esta técnica consiste en el disgregado de la gónada hermafrodita en solución isotónica pH 8,4, lavado de sus elementos celulares mediante centrifugación a 800 r. p. m. y su observación en microscopio de contraste de fase.

Confección de cariotipos: Los bivalentes en paquitene se recortaron de las microfotografías; se denominaron con los números 1-17 y se alinearon según sus cinetocoros. El criterio empleado para la clasificación de los bivalentes se basó en la longitud y en el índice de brazos, según la nomenclatura de LEVAN, FREDGA Y SANBERG (1964).

RESULTADOS

Análisis cromosómico y cariotípico: Del análisis de las premetafases y metafases gonadales, puede decirse que los cromosomas se observaron muy pequeños y contraídos, con un número modal de $2n=34$, lo que fue corroborado por los 17 bivalentes en paquitene y diacinesis. Debido a que la morfología de los cromosomas metafásicos no permitió un análisis exhaustivo para la confección de cariotipos, éstos fueron elaborados con los bivalentes en paquitene. Dichos cromosomas se alinearon por los cinetocoros y se agruparon según la longitud y el índice de brazos. Es así que se han identificado 4 bivalentes con cinetocoro en la región medial, 4 en la submedial, 5 en la subterminal y 4 en la terminal. Los resultados abordados implican una clasificación ordenada en grupos y no una identificación individual absoluta de los bivalentes. Sin embargo, algunos hechos son destacables y merecen su atención:

Algunos cromómeros se manifiestan como zonas heteropícnóticas positivas, debido a su mayor grado de espiralización y condensación del ADN, sirviendo como marcas de identificación cromosómicas.

Se han observado knobs o nudos terminales en algunos de los bivalentes (1, 6 y 12).

Frecuentemente se ha detectado la asociación de uno de los bivalentes al nucleolo, que según la longitud, la posición del cinetocoro y la presencia de un nudo terminal, se trataría del número 6. (ALDERETE DE MAJO, MERCADO LACZKO Y USANDIVARAS, 1996)

Análisis de los elementos celulares que intervienen en el proceso de espermatogénesis y morfología de los gametos masculinos: Los resultados obtenidos permiten concluir que el proceso de espermatogénesis se lleva a cabo a través de 5 divisiones mitóticas, no siempre sincrónicas, desde espermatogonias aisladas y agrupadas (2, 4, 8 y 16) y unidas por puentes citoplasmáticos, hasta espermatocitos I (conglomerados de más o menos 32 elementos celulares alrededor

de una masa citoplasmática o citóforo) y de la división meiótica, que conduce a la formación de espermatoцитos II (grupos de 64 núcleos, siendo este número variable debido a la asincronía de las divisiones celulares inmersos en un citóforo destacable) y de espermátidas (agrupaciones de 128 elementos celulares con el máximo desarrollo del citóforo), las que se transforman en espermatozoides. Estos últimos pierden todos los puentes citoplasmáticos y no presentan conexiones con otras células. Los gametos masculinos presentan un núcleo corto, redondeado, ovalado o algo cónico y un largo flagelo, que mide alrededor de 350 μm de longitud.

Los elementos celulares de la línea germinal masculina se observan junto a los de la femenina, y se diferencian de los mismos en base a que los núcleos de las ovogonias presentan un tamaño considerablemente mayor que el de las espermatogonias y además, porque las células que intervienen en el proceso de la espermatogénesis constituyen conglomerados y no así los de la línea germinal femenina (ALDERETE DE MAJO, USANDIVARAS Y MERCADO LACZKO, 1996).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la introducción, ya hemos considerado los números cromosómicos en varios grupos de Euthyneura. Además, dentro de los Soleolifera han sido previamente estudiadas cinco especies pertenecientes a las familias Onchidiidae y Veronicellidae, que son *Onchidella kurodai* y *Onchidella evellinae* ($n=17$) y *Onchidium verruculatum* ($n=18$), dentro de la primera y *Veronicella floridana* ($n=16$) y *Laevicaulis alte* ($n=17$) correspondientes a la segunda. Todo ello nos permite concluir que los valores del número haploide varían entre 16-18, siendo el más frecuente el 17. Por otra parte, *Vaginula solea* d'Orbigny, que también tiene un $n=17$ (RIVA Y VIDAL, 1973), fue denominada *Vaginula borelliana* (Colosi) por HYLTON SCOTT (1936) y *Phyllocaulis soleiformis* d'Orbigny por THOMÉ (1975) y por ende también perte-

nec a los Veronicellidae, con lo cual el número de especies estudiadas previamente a nuestras investigaciones en los Soleolifera, ascendería a seis y en los Veronicellidae a tres (Fig. 1). De lo antes expuesto puede inferirse que, tanto las tres últimas especies estudiadas como *Sarasinula linguaeformis*, que es motivo de este estudio, ocupan una posición filogenética muy particular entre los Euthyneura y no estarían, por lo menos desde el punto de vista cromosómico, estrechamente relacionadas con las babosas estudiadas por BEESON (1960), que presentan los números haploides más altos entre los Stylommatophora (30, 31 y 34). De ser así, la ubicación sistemática de este grupo sería inmediatamente antes de los Basommatophora, entre los Euthyneura.

En cuanto a la morfología del espermatozoide, cabe decir que fue descrita en los moluscos, tanto con microscopía óptica como electrónica, por numerosos autores. Entre ellos cabe citar a TUZET (1950), quien describió la espermiogénesis en un gran número de animales, incluyendo gasterópodos y fundamentó la morfología de los espermatozoides en relaciones filogenéticas. Por otra parte, FRANZEN (1956), describió que la forma de estas células de alguna manera está relacionada con el modo de fecundación. Así, los animales que descargan el esperma en el agua, presentan un tipo primitivo. Según él, en los Metazoos, esta estructura está basada en una cabeza corta, redondeada o cónica y generalmente con un acrosoma variable, una pieza intermedia conteniendo 4 a 5 mitocondrias esféricas agregadas y una cola, consistente en un largo flagelo. En cambio, en los que tienen otros mecanismos, ya sea transfiriendo directamente a la hembra espermatozoides o bien a través de órganos de copulación, la morfología del espermatozoide se altera de un modo u otro. En efecto, las formas que evolucionan a partir del modelo primitivo tienen una pieza media tubular, más o menos alargada, y la cola formada por un largo flagelo. El tipo más sofisticado de espermatozoide es filiforme (FRANZEN, 1970; ver además AFZELIUS,

1979). En ALDERETE DE MAJO, USANDIVARAS Y MERCADO LACZKO (1996) se discute este argumento y se describe el modelo de espermatozoide de *Sarasinula linguaeformis*.

En base a estos datos, puede indicarse que la morfología de los gametos motivo de este estudio y el número cromosómico ($n=17$), apoyarían la hipótesis que considera a los Veronicellidae como un nuevo grupo prepulmonado. La posición antes mencionada estaría también apoyada por el análisis de elementos de la morfología de este grupo. Así, la presencia de una cavidad pulmonar, no derivada de tejidos de la cavidad paleal, representa una nueva formación (FRETTER, 1943; HOFFMANN, 1925). Otros caracteres ostensiblemente idénticos a los de Pulmonata, como tentáculos con omatóforos, órgano excretor laminado, inervación del pene, etc., son considerados análogos (PLATE, 1893; BOETTGER, 1952; MORTON, 1955; VAN MOL, 1967; SALVINI-PLAWEN, 1970; MINICHEV, 1975; STAROBOGATOV, 1976). Además, algunos hechos como el procrebro, glándulas cerebrales y glándulas pares de la albú-

mina, apuntan a un origen estrechamente relacionado con los Archaeopulmonata. Sin embargo, el sistema nervioso junto con la posición de la cavidad del manto y la detorsión de la apertura genital femenina, muestra a los Veronicellidae como un nuevo grupo prepulmonado. Otros caracteres, como por ejemplo la detorsión y las células vacuoladas, evidencian una relación distinta con los primitivos Opisthobranchia. Lo antes expuesto lleva a considerar a los Veronicellidae como una línea evolutiva *per se*, separada tanto de los Opisthobranchia como de los Pulmonata (STRINGER, 1963; MORTON, 1963; SALVINI-PLAWEN, 1970, 1980; MINICHEV, 1975).

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Dr. J. W. Thomé la identificación de la especie estudiada, a la Lic. A. C. Mercado Laczkó la lectura del manuscrito y su colaboración junto al Ing. Pablo Braiovich, en la transcripción con procesador de textos en computadora.

BIBLIOGRAFÍA

- AFZELIUS, B. A., 1979. Sperm structure in relation to Phylogeny in lower metazoa. En Fawcett, D. W. y Bedford, J. M. (Eds.): *The Spermatozoon: Maturation, Motility, Surface Properties and Comparative Aspects*. Urban y Schwarzenberg, Baltimore, Munich, xvi+ 441 pp.
- ALDERETE DE MAJO, A. M., 1988. *Estudios citológicos en oligoquetos terrícolas de la provincia de Tucumán*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, vii+ 217 pp.
- ALDERETE DE MAJO, A. M., TOMSIC, Z., DULOUT, F. N. y TEISAIRE, E. S., 1979. Espermatoogénesis de *Pheretima hawayana* (Rosa) (Oligochaeta, Megascolecidae). *Acta zoológica Lilloana*, 35 (1): 243-247.
- ALDERETE DE MAJO, A. M., MERCADO LACZKO, A. C. y USANDIVARAS, E. M., 1996. Los cromosomas de *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae). *Iberus*, 14 (2): 155-160.
- ALDERETE DE MAJO, A. M., USANDIVARAS, E. M. y MERCADO LACZKO, A. C., 1996. Espermatoogénesis en *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae). *Iberus*, 14 (2): 161-168.
- BEESON, G. E., 1960. Chromosome numbers of slugs. *Nature*, 186: 257-258.
- BOETTGER, C. R., 1952. Die Stämme des Tierreichs in ihrer Systematischen Gliederung. *Abhandlungen der Braunschweigischen wissenschaftlichen Gesellschaft*, 4: 238-300.
- BOETTGER, C. R., 1955. Die Systematik der euthyneurin Schnecken. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft*, 1954: 253-280.
- BURCH, J. B., 1960. Chromosome studies of aquatic Pulmonate snails. *The Nucleus*, 3 (2): 177-208.
- CARR, D. H. y WALKER, J. E., 1961. Carbol fuchsine as a stain for mammalian chromosomes. *Stain Technology*, 36: 233-236.
- FRANZEN, A., 1955. Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, 30: 399-456.
- FRANZEN, A., 1956. On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon and biology of fertilization among invertebrates. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, 31: 355-382.